(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-538453
(P2004-538453A)
(43)公表日　平成16年12月24日(2004.12.24)

(51)Int.Cl.[7]	F I	テーマコード（参考）
G01N 33/543	G01N 33/543 521	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 52 頁）

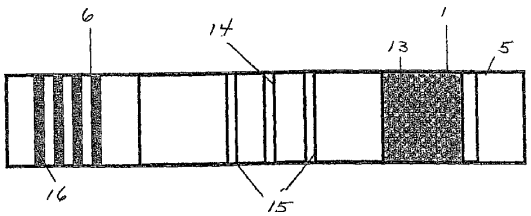
(21)出願番号	特願2003-514229(P2003-514229)
(86)(22)出願日	平成14年7月18日(2002.7.18)
(85)翻訳文提出日	平成16年1月19日(2004.1.19)
(86)国際出願番号	PCT/US2002/023164
(87)国際公開番号	WO2003/008933
(87)国際公開日	平成15年1月30日(2003.1.30)
(31)優先権主張番号	60/306,660
(32)優先日	平成13年7月18日(2001.7.18)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人　504022076
ゾー，　スーリャン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５４２，　ヘイワード，　マークハム　コート　２７１１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ゾー，　スーリャン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５４２，　ヘイワード，　マークハム　コート　２７１１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】全細胞を含有するサンプルに対するラテラルフローアッセイのための試験片

(57)【要約】
細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを行うための試験片、およびこの試験片を作製および使用するための方法が提供される。この試験片は、商業的に、例えば、全血中の分析物の検出に関心のある場所での診断デバイスにおいて、使用可能である。本発明は、以下を備える試験片を提供する：（ａ）第１端部および第２端部を有するクロマトグラフィー片を含む第１のメンブラン；および
（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター；ここで、該サンプルフィルターの該下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触し；該サンプルフィルターは、サンプル中の流体から該サンプル中の細胞を分離し得、そして該クロマトグラフィー片に、該流体を通過させ、そしてさらに、該試験片は、該クロマトグラフィー片の第２端部に向けた、該サンプルフィルターからの流体のラテラルフローを容易にする。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
試験片であって、以下：
（ａ）第１端部および第２端部を有するクロマトグラフィー片を含む第１のメンブラン；および
（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター
を備え、ここで、該サンプルフィルターの該下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触し；ここで、該サンプルフィルターは、サンプル中の流体から該サンプル中の細胞を分離し得、そして該クロマトグラフィー片に、該流体を通過させ、そしてさらに、ここで、該試験片は、該クロマトグラフィー片の第２端部に向けた、該サンプルフィルターからの流体のラテラルフローを容易にする、試験片。
【請求項２】
請求項１に記載の試験片であって、ここで、前記サンプルフィルターは、種々のサイズの細孔を含み、そして、ここで、前記サンプル中の細胞は、該サンプルフィルターにより保持され、そして前記サンプル中の流体は、該サンプルフィルターを通過する、試験片。
【請求項３】
請求項２に記載の試験片であって、ここで、前記サンプルフィルターは、第１の孔サイズを有する第１の細孔および第２の孔サイズを有する第２の細孔を含み、ここで、該第１の細孔は、該第２の細孔よりも大きく、そしてさらにここで、該第１の細孔は、該サンプルフィルターの上側表面に対して近く、そして該第２の細孔は、該サンプルフィルターの下側表面に対して近い、試験片。
【請求項４】
請求項１または２に記載の試験片であって、さらに、（ｃ）前記クロマトグラフィー片の第１端部に近接するサンプルパッドを備え、そしてここで、該サンプルパッドは、該クロマトグラフィー片に前記流体を通過させ、そしてさらにここで、前記試験片は、該クロマトグラフィー片の第２端部に向けた、該サンプルパッドからの該サンプル中の流体のラテラルフローを支持する、試験片。
【請求項５】
請求項３に記載の試験片であって、さらに、（ｃ）上側表面および下側表面を含むサンプルパッドを備え、ここで、該サンプルパッドの下側表面は、前記クロマトグラフィー片と毛管接触しており、そしてここで、該サンプルフィルターの下側表面が、該サンプルパッドの上側表面と毛管接触しており、そしてさらにここで、該試験片は、該クロマトグラフィー片の第２の端部に向けた、該サンプルパッドからの該サンプル中の流体のラテラルフローを支持する、試験片。
【請求項６】
前記サンプルフィルターおよび前記サンプルパッドと毛管接触した選択性膜をさらに備える、請求項４または５に記載の試験片。
【請求項７】
前記が、前記サンプルフィルターの下に位置付けられる、請求項６に記載の試験片。
【請求項８】
前記選択性膜が、前記サンプルパッドの上部の上、または前記クロマトグラフィー片の上部の上に位置付けられる、請求項６に記載の試験片。
【請求項９】
前記選択性膜が、前記サンプル中の成分に選択的に結合し、そしてアッセイ環境から該成分を取出す薬剤を含む、請求項６に記載の試験片。
【請求項１０】
前記薬剤が、抗体、抗原、代謝生成物、ホルモン、酵素、ウイルス、プリオン、またはそれらの部分、およびこれらに結合する薬剤からなる群より選択される、請求項９に記載の試験片。
【請求項１１】

前記サンプルフィルターと前記クロマトグラフィー片との間に位置付けられた１つ以上のフィルターまたはメンブランをさらに含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の試験片。

【請求項１２】

請求項４～１１のいずれか一項に記載の試験片であって、さらに、以下：

（ｄ）上側表面および下側表面を含む結合体パッドであって、ここで、該結合体パッドは前記クロマトグラフィー片の第２の端部に、またはこの第２の端部の付近にあり、そしてここで、該結合体パッドの下側表面は、該クロマトグラフィー片と毛管接触している、結合体パッド；

（ｅ）上側表面および下側表面を含む試薬パッドであって、ここで、該試薬パッドの下側表面は、該結合体パッドの上側表面と毛管接触している、試薬パッド；ならびに

（ｆ）該クロマトグラフィー片の第１の端部での、かつ該結合体パッドから離れている前記サンプルパッドの側面に対する吸収パッドであって、該吸収パッドは、該クロマトグラフィー片と毛管接触している、吸収パッド；

を備え、そしてここで、該サンプルフィルターは、サンプル中の流体から細胞を分離し得、そして該試験片は、該結合体パッドに向けた、該サンプルパッドからの該サンプル中の流体のラテラルフローを支持する、試験片。

【請求項１３】

前記試薬パッドが、試薬をさらに含む、請求項１２に記載の試験片。

【請求項１４】

前記試薬が、緩衝液である、請求項１３に記載の試験片。

【請求項１５】

請求項１２に記載の試験片であって、前記結合体パッドが、該結合体パッドへの流体の適用の際に該結合体パッドから放出され得る結合体を含み、ここで、該結合体は、検出され得る分析物と結合して、検出可能なシグナルを形成し得る、試験片。

【請求項１６】

前記結合体が、分析物に結合し得る第１の結合薬剤を含む、請求項１２に記載の試験片。

【請求項１７】

前記結合薬剤が、抗体または抗原である、請求項１６に記載の試験片。

【請求項１８】

前記結合体が、第２の結合薬剤をさらに含む、請求項１６に記載の試験片。

【請求項１９】

前記第２の結合薬剤が、第１の結合薬剤または分析物のいずれかに結合する検出可能なマーカーを含む、請求項１８に記載の試験片。

【請求項２０】

前記検出可能なマーカーが定量可能である、請求項１９に記載の試験片。

【請求項２１】

前記結合体が、前記結合体パッドから流動して、前記サンプル由来の流体と接触し、そして固定された複合体を形成する、請求項１５に記載の試験片。

【請求項２２】

請求項１５に記載の試験片であって、ここで、前記結合体パッドが、前記サンプルフィルターと前記クロマトグラフィー片の第２端部との間に置かれ、そして該サンプルフィルターから該結合体パッドへの流体の流動は、該結合体パッドから前記結合体を放出する、試験片。

【請求項２３】

前記結合体パッドが、前記サンプルフィルターの下に置かれ、そして該サンプルフィルターと毛管接触している、請求項１５に記載の試験片。

【請求項２４】

前記クロマトグラフィー片が、接着層および該接着層のための裏材をさらに含む、請求項１～２３のいずれか１項に記載の試験片。

【請求項２５】
前記メンブランが、ニトロセルロースを含む、請求項１～２４のいずれか１項に記載の試験片。
【請求項２６】
前記サンプルフィルターが、血球／血漿分離メンブランである、請求項１～２５のいずれか１項に記載の試験片。
【請求項２７】
前記サンプルが、流体および細胞を含む、請求項１～２６のいずれか１項に記載の試験片。
【請求項２８】
請求項１～２６のいずれか１項に記載の試験片であって、前記サンプルが、血液サンプル、唾液サンプル、尿サンプル、リンパ組織から得たサンプル、脊髄穿刺から得たサンプル、腹膜腔から得たサンプル、関節から得た滑液、または肺からの流体である、試験片。
【請求項２９】
前記サンプルが、赤血球である、請求項２８に記載の試験片。
【請求項３０】
前記サンプルフィルターが、該サンプルを接触する親水性表面を含む、請求項１～２９のいずれか１項に記載の試験片。
【請求項３１】
前記サンプルフィルターが、Ｓ／Ｇメンブランを含む、請求項１～３０のいずれか１項に記載の試験片。
【請求項３２】
試験片を作製する方法であって、以下の工程：
（ａ）第１の端部および第２の端部を有するクロマトグラフィー片を提供する工程；および
（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルターを提供する工程、
を包含し、
ここで、該サンプルフィルターの下側表面は、該クロマトグラフィー片と毛管接触しており；ここで、該サンプルフィルターは、サンプル中の流体から該サンプル中の細胞を分離し得、そして該クロマトグラフィー片に該流体を通過させ、そしてさらにここで、該試験片は、該クロマトグラフィー片の第２の端部へ向けた、該サンプルフィルターからの流体のラテラルフローを促進する、方法。
【請求項３３】
請求項３２に記載の方法であって、さらに、以下の工程：
（ｃ）前記サンプルフィルターと前記クロマトグラフィー片との間にサンプルパッドを置く工程を包含し、
ここで、該サンプルパッドは、該サンプルフィルターおよび該クロマトグラフィー片と毛管接触し、そして流体が、毛細管または浸透圧の力により、該サンプルフィルターから該サンプルパッドを通って、該クロマトグラフィー片へと流動する、方法。
【請求項３４】
請求項３３に記載の方法であって、さらに、以下の工程：
（ｄ）前記クロマトグラフィー片上に結合体パッドを提供する工程を包含し、
ここで該結合体パッドは、該クロマトグラフィー片と毛管接触し、そして流体が、毛細管または浸透圧の力により、該結合体パッドを通って、該クロマトグラフィー片へと流動する、方法。
【請求項３５】
請求項３４に記載の方法であって、さらに、以下の工程：
（ｅ）前記結合体パッド上に試薬パッドを提供する工程工程を包含し、
ここで、該試薬パッドは、該結合体パッドと毛管接触し、そして該試薬パッドから該結合体パッドへの流体の流動を可能にする、方法。

【請求項３６】
請求項３５に記載の方法であって、さらに、以下の工程：
（ｆ）前記サンプルフィルターと前記クロマトグラフィー片との間に選択性膜を提供する工程を包含し、
ここで、該選択性膜は、該サンプルフィルターおよび該クロマトグラフィー片と毛管接触し、そして該サンプルフィルターから該クロマトグラフィー片への流体の流動を可能にする、方法。
【請求項３７】
サンプル中の分析物の検出のためにラテラルフローアッセイを行うために、該サンプル中の流体から細胞を分離する方法であって、以下の工程：
（ａ）請求項１～３１のいずれかに記載の試験片を提供する工程；および
（ｂ）該サンプルをサンプルフィルター上にアプライして、それにより、サンプル中の流体から細胞を分離する工程、
を包含する、方法。
【請求項３８】
細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを行うための方法であって、以下の工程：
（ａ）請求項１５～３１のいずれかに記載の試験片を提供する工程；
（ｂ）該サンプルをサンプルフィルターにアプライする工程；
（ｃ）該サンプルフィルターから該クロマトグラフィー片へと、該クロマトグラフィー片の第２の端部に向けて、流体を流動させる工程；
（ｄ）緩衝液をアプライして、結合体パッド中の結合体を放出する工程；
（ｅ）該サンプル中の分析物に向けて該結合体を流動させて、複合体を形成する工程；および
（ｆ）該複合体の存在を検出する工程、
を包含する、方法。
【請求項３９】
請求項３８に記載の方法であって、さらに以下の工程：
（ｇ）形成された複合体の量を定量する工程、
を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、医療分野および診断分野に関する。特に、本発明は、全細胞を含有するサンプル中の分析物（例えば、血液サンプル中の血液細胞）の検出のためのラテラルフロー（ｌａｔｅｒａｌ　ｆｌｏｗ）アッセイに関する。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
ＰｒａｘＳｙｓ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓは、米国特許第６，１３６，６１０号に記載されるような、ＲｅＬＩＡ技術を開発した。ＰｒａｘＳｙｓデバイスは、分析されるサンプルが全細胞（例えば、赤血球細胞を含有する血液サンプル）を含む場合に使用するのに適していない試験片を含む。従って、全細胞を含有するサンプル中の分析物の検出のために使用され得る試験片に対する満たされていない必要性が残っている。
【０００３】
米国特許第５，２４０，８６２号は、血液分離物を記載する。しかし、この分離法は、デバイスにおいて分離膜および収集膜の使用、収集膜からの分離膜の除去、およびさらなる分析のための収集膜の使用を必要とする。この方法は、扱いにくく、ラテラルフローアッセイに使用するのに適していない。

【０００４】
従って、全細胞を含有するサンプル中の分析物の検出のためのより簡単な方法に対する必要性もまた、残っている。
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
満たされていない必要性に取り組み、そして先行技術の試験片の欠点を克服するために、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための、商業的に使用可能な試験片が、本明細書中で提供される。特定の実施形態において、この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；ならびに（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触しており、サンプルフィルターは、サンプル中の流体からサンプル由来の細胞を分離し得、そしてこの流体が、クロマトグラフィー片を通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部への流体のラテラルフローを補助する）を備える。
【０００６】
本発明の別の実施形態において、分析され得るサンプルが体液サンプルである、本明細書中に記載されるような試験片が提供される。本発明のさらなる実施形態において、サンプルは、血液サンプル、唾液サンプル、尿サンプル、リンパ組織から採取されたサンプル、脊椎穿刺から採取されたサンプル、または腹膜腔から採取されたサンプル、関節由来の滑膜液、もしくは肺由来の体液である。
【０００７】
本発明の別の実施形態において、サンプルフィルターが、サンプルと接触する表面を備え、そしてその表面は親水性である、本明細書中に記載されるような試験片が提供される。
【０００８】
本発明のさらに別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；ならびに（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触しており、そしてサンプルフィルターは、異なる孔サイズの孔を備え、サンプル由来の細胞がサンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体がサンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。
【０００９】
本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；ならびに（ｂ）上側表面および下側表面、ならびに第１孔および第２孔を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触しており、第１孔は、サンプルフィルターの上側表面により近く、第２孔は、サンプルフィルターの下側表面により近く、第１孔は、第１孔サイズを有し、第２孔は第２孔サイズを有し、そして第１孔サイズは、第２孔サイズよりも大きく、サンプルフィルターは、サンプル由来の細胞が、サンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体が、サンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。
【００１０】
本発明のなお別の実施形態において、赤血球を含むサンプル中の分析物の検出のためのラ

テラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；ならびに（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触しており；そしてサンプルフィルターは、サンプル中の流体からサンプル中の赤血球細胞を分離し得、そして流体が、クロマトグラフィー片を通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部への流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００１１】

本発明のさらに別の実施形態において、赤血球を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；ならびに（ｂ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触しており、サンプルフィルターは、異なる孔サイズの孔を備え、サンプル由来の赤血球細胞がサンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体がサンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００１２】

本発明の別の実施形態において、赤血球細胞を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片がさらに提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；ならびに（ｂ）上側表面および下側表面、ならびに第１孔および第２孔を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触しており、第１孔は、サンプルフィルターの上側表面により近く、第２孔は、サンプルフィルターの下側表面により近く、第１孔は、第１孔サイズを有し、第２孔は第２孔サイズを有し、そして第１孔サイズは、第２孔サイズよりも大きく、サンプルフィルターは、サンプル由来の細胞が、サンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体が、サンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００１３】

本発明のさらに別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近くに位置するサンプルパッド（このサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、サンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触している）；ならびに（ｃ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触しており；そしてサンプルフィルターは、サンプル中の流体からサンプル中の細胞を分離し得、そしてこの流体が通過するのを可能にし、そしてサンプルパッドはまた、流体がクロマトグラフィー片の方に通過するのを可能にし、そして試験片は、サンプルパッドからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００１４】

本発明の別の実施形態において、サンプルは血液サンプルであり、細胞は血液細胞である、本明細書中に記載される試験片が提供される。

【００１５】

本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片がさらに提供される。この試験片は、

（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近くに位置するサンプルパッド（このサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、サンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触している）；ならびに（ｃ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触しており；サンプルフィルターは、異なる孔サイズの孔を備え、サンプル由来の細胞がサンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体がサンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルパッドからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００１６】

本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片がさらに提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近くに位置するサンプルパッド（このサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、サンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触している）；ならびに（ｃ）上側表面および下側表面ならびに第１孔および第２孔を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触しており、第１孔は、サンプルフィルターの上側表面により近く、第２孔は、サンプルフィルターの下側表面により近く、第１孔は第１孔サイズを有し、第２孔は第２孔サイズを有し、そして第１孔サイズは、第２孔サイズよりも大きく、サンプルフィルターは、サンプル由来の細胞が、サンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体が、サンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルパッドからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００１７】

本発明のさらに別の実施形態において、選択性膜をさらに備える、本明細書中に記載されるような試験片を提供する。選択性膜は、サンプルフィルターの下に配置される。本発明の実施形態において、サンプルパッドの上部に置かれた選択性膜が提供される。本発明の別の実施形態において、選択性膜は、クロマトグラフィー片の上部に置かれる。いかなる場合も、選択性膜は、サンプルフィルターおよびサンプルパッドまたはクロマトグラフィー片と毛管接触しており、流体が、毛細管力または浸透力の下で選択性膜を通過するのを可能にする。選択性膜は、サンプル中の成分に選択的に結合し得、アッセイ環境からその成分を効果的に除去する薬剤を含む。

【００１８】

本発明の別の実施形態において、１つ以上の目的のために、サンプルフィルターとクロマトグラフィー片との間に１つ以上の他のフィルターまたは膜が、さらに提供される。ただし、さらなる１つ以上の膜は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片への流体の毛細管流または浸透流を損なわず、そして合わせたフィルターまたは膜の高さは、試験片がカセットに適合し、機器において読み取られる能力を損なわない。

【００１９】

本発明の実施形態において、上記の選択性膜は、抗体、抗原、代謝産物、ホルモン、酵素、ウイルス、プリオン、もしくはそれらの部分である薬剤、またはそれらに結合する薬剤を含む。

【００２０】

本発明のさらに別の実施形態において、赤血球細胞を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近くに位置するサンプルパッド（このサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、サンプルパッドの下側表

面は、クロマトグラフィー片と毛管接触している）；ならびに（ｃ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触しており、そしてサンプルフィルターは、サンプル中の流体からサンプル中の赤血球細胞を分離し得、そして流体が通過するのを可能にし、サンプルパッドはまた、流体がクロマトグラフィー片を通過するのを可能にし、そして試験片は、サンプルパッドからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００２１】

本発明のさらなる実施形態は、また、サンプルパッドが流体を接触する表面を有し、その表面が親水性である、本明細書中に記載されるような試験片が提供される。

【００２２】

本発明の別の実施形態において、赤血球細胞を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近くに位置するサンプルパッド（このサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、サンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触している）；ならびに（ｃ）上側表面および下側表面を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触しており、サンプルフィルターは、異なる孔サイズの孔を備え、サンプル由来の赤血球細胞がサンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体がサンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルパッドからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００２３】

本発明のさらに別の実施形態において、血液細胞を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイを実施するための試験片が提供される。この試験片は、（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１膜（このクロマトグラフィー片は、第１端部および第２端部を有する）；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近くに位置するサンプルパッド（このサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、サンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触している）；ならびに（ｃ）上側表面および下側表面、ならびに第１孔および第２孔を有するサンプルフィルター（このサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドと毛管接触しており、第１孔は、サンプルフィルターの上側表面により近く、第２孔は、サンプルフィルターの下側表面により近く、第１孔は、第１孔サイズを有し、第２孔は第２孔サイズを有し、そして第１孔サイズは、第２孔サイズよりも大きく、サンプルフィルターは、サンプル由来の赤血球細胞が、サンプルフィルターに保持され、そしてサンプル中の流体が、サンプルフィルターを通過するのを可能にし；そして試験片は、サンプルパッドからクロマトグラフィー片の第２端部へのサンプル中の流体のラテラルフローを補助する）を備える。

【００２４】

さらに、本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施するための試験片が提供される。ここでこの試験片は、以下：（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１の膜であって、ここでこのクロマトグラフィー片が、第１端部および第２端部を備える、第１の膜；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近傍に配置されるサンプルパッドであって、ここでこのサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこのサンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触する、サンプルパッド；（ｃ）上側表面および下側表面を備えるサンプルフィルターであって、ここでこのサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触する、サンプルフィルター；（ｄ）クロマトグラフィー片の第２端部にまたはその近傍に位置する結合体パッドであって、ここでこの結合体パッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこの結合体パッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触する、結合体パッド；（ｅ）上側表面および下側表面を備える試薬パッドであ

って、ここでこの試薬パッドの下側表面は、結合体パッドの上側表面と毛管接触する、試薬パッド；および（ｆ）クロマトグラフィー片の第１端部で結合体パッドから離れたサンプルパッドの一方の側に位置する吸収パッドであって、ここでこの吸収パッドは、クロマトグラフィー片と毛管接触する、吸収パッド、を備え；そしてここで、このサンプルフィルターは、サンプル中の流体から細胞を分離することが可能であり、そして試験片は、サンプルパッドから結合体パッドに向かうサンプル中の流体のラテラルフローを支持する。

【００２５】

さらに、本発明の１つの実施形態において、試薬パッドが結合体パッドから結合体を放出するための試薬（例えば、緩衝液）の適用に適している、本明細書中に記載される試験片が提供される。

【００２６】

本発明のさらなる実施形態において、サンプルフィルターと同じであり得るかまたは異なり得る、試薬パッドが提供される。試薬パッドがサンプルフィルターと同じである場合、サンプルは、結合体パッドから結合体を放出するための試薬パッドに適用され得るが、このサンプルは、結合体と反応して、アッセイの実施のためのクロマトグラフィー片上の流体の毛管流または浸透流を損なう、いずれの複合体も形成することはない場合のみである。

【００２７】

本発明の別の実施形態において、全細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施するための試験片が提供され、ここでこの試験片は、以下：（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１の膜であって、ここでこのクロマトグラフィー片が、第１端部および第２端部を備える、第１の膜；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部に配置されるサンプルパッドであって、ここでこのサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこのサンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触する、サンプルパッド；（ｃ）上側表面および下側表面を備えるサンプルフィルターであって、ここでこのサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触し、そしてここでこのサンプルフィルターは、種々の孔サイズを備え、そして細胞をこのサンプルフィルター中に保持し、そしてこのサンプルフィルターを通して流体を通過させる、サンプルフィルター；（ｄ）クロマトグラフィー片の第２端部に位置する結合体パッドであって、ここでこの結合体パッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこの結合体パッドの下側表面は、クロマトグラフィー片の少なくとも一部と毛管接触する、結合体パッド；（ｅ）上側表面および下側表面を備える試薬パッドであって、ここでこの試薬パッドの下側表面は、結合体パッドの上側表面と毛管接触する、試薬パッド；および（ｆ）クロマトグラフィー片の第１端部で結合体パッドから離れたサンプルパッドの一方の側に位置する吸収パッドであって、ここでこの吸収パッドは、クロマトグラフィー片と毛管接触する、吸収パッド、を備え、そしてここで、試験片は、サンプルパッドから結合体パッドに向かうサンプル中のラテラルフローを支持する。

【００２８】

さらに、本発明の別の実施形態において、細胞全体および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施するための試験片が提供され、ここで、この試験片は、以下：（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１の膜であって、ここでこのクロマトグラフィー片が、第１端部および第２端部を備える、第１の膜；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部に配置されるサンプルパッドであって、ここでこのサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこのサンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触する、サンプルパッド；（ｃ）上側表面および下側表面ならびに第１の孔および第２の孔を備えるサンプルフィルターであって、ここでこのサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触し、第１の孔は、サンプルフィルターの上側表面に接近しており、そして第２の孔は、サンプルフィルターの下側表面に接近しており、第１の孔は第１の孔サイズを有し、そして第２の孔は第２の孔サイズを有し、そして第１の孔サイズが第２の孔サイズより大きい場合、サンプルフィルターは、細胞をこ

のサンプルフィルター中に保持し、そしてこのサンプルフィルターを通して流体を通過させる、サンプルフィルター；（ｄ）クロマトグラフィー片の第２端部に位置する結合体パッドであって、ここでこの結合体パッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこの結合体パッドの下側表面は、クロマトグラフィー片の少なくとも一部と毛管接触する、結合体パッド；（ｅ）上側表面および下側表面を備える試薬パッドであって、ここでこの試薬パッドの下側表面は、結合体パッドの上側表面と毛管接触する、試薬パッド；および（ｆ）クロマトグラフィー片の第１端部で結合体パッドから離れたサンプルパッドの一方の側に位置する吸収パッドであって、ここでこの吸収パッドは、クロマトグラフィー片と毛管接触する、吸収パッド、を備え、そしてここで、試験片は、サンプルパッドから結合体パッドに向かうサンプル中の流体のラテラルフローを支持する。

【００２９】

本発明の別の実施形態において、血液細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施するための試験片がさらに提供され、ここで、この試験片は、以下：（ａ）クロマトグラフィー片を含む第１の膜であって、ここでこのクロマトグラフィー片が、第１端部および第２端部を備える、第１の膜；（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部に配置されるサンプルパッドであって、ここでこのサンプルパッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこのサンプルパッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触する、サンプルパッド；（ｃ）上側表面および下側表面を備えるサンプルフィルターであって、ここでこのサンプルフィルターの下側表面は、サンプルパッドの上側表面と毛管接触し、このサンプルフィルターは、このサンプル中の流体から赤血球を分離し得る、サンプルフィルター；（ｄ）クロマトグラフィー片の第２端部に位置する結合体パッドであって、ここでこの結合体パッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこの結合体パッドの下側表面は、クロマトグラフィー片の少なくとも一部と毛管接触する、結合体パッド；（ｅ）上側表面および下側表面を備える試薬パッドであって、ここでこの試薬パッドの下側表面は、結合体パッドの上側表面と毛管接触する、試薬パッド；および（ｆ）クロマトグラフィー片の第１端部で結合体パッドから離れたサンプルパッドの一方の側に位置する吸収パッドであって、ここでこの吸収パッドは、クロマトグラフィー片と毛管接触する、吸収パッド、を備え、そしてここで、試験片は、サンプルパッドから結合体パッドに向かうサンプル中の流体のラテラルフローを支持する。

【００３０】

本発明の別の実施形態において、本明細書中に記載される試験片がさらに提供され、この試験片は、以下：（ｄ）サンプルパッドとクロマトグラフィー片の第２端部との間に位置する結合体パッドであって、ここでこの結合体パッドは、上側表面および下側表面を備え、そしてこの結合体パッドの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触する、結合体パッド；および（ｆ）クロマトグラフィー片の第２端部に位置する吸収パッドであって、ここでこの吸収パッドは、クロマトグラフィー片と毛管接触する、吸収パッド、をさらに備え、そしてここで、試験片は、サンプルパッドから結合体パッドに向かうサンプル中の流体ラテラルフローを支持し得る。

【００３１】

本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのクロマトグラフィー片に対する免疫アッセイの実施に適する、本明細書中に記載される試験片が提供される。本発明の１つの局面において、この試験片は、流体を結合体パッドに適用する際に結合体パッドから放出され得る結合体を含み、ここでこの結合体は、分析物の存在を示す、検出可能なシグナルを得るように検出される分析物と組み合わせられ得る。本発明の別の局面において、結合体は、分析物に結合し得る第１の結合薬剤を含む。分析物が抗体である場合、第１の結合薬剤の例として、抗体および抗原が挙げられる。本発明のさらなる局面において、結合体は、第２の結合薬剤を含み、ここで、この第２の結合薬剤は、検出マーカーを含み、そして第１の結合薬剤または分析物のいずれかに結合する。

【００３２】

本発明のさらなる実施形態において、検出シグナルは、定量され得る。このような例において、本発明のイムノアッセイは、定量的イムノアッセイである。

【００３３】

本発明のさらに別の実施形態において、本明細書中に記載される試験片が提供され、ここで、このクロマトグラフィー片は、クロマトグラフィー片の第１端部の近傍に位置するサンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部までの流体の毛管流を支持し、そしてクロマトグラフィー片の第２端部からクロマトグラフィー片の第１端部に向かう、結合体パッドから放出された結合体の毛管流を支持して、結合体がサンプルからの流体と接触するようになり、固定された複合体を形成させ、複合体の検出を可能にする。

【００３４】

本発明のさらに別の実施形態において、結合体パッドが、イムノアッセイを可能かつ容易にするようなクロマトグラフィー片上の任意の適切な位置に配置される、本明細書中に記載される試験片がまた適用される。

【００３５】

本発明のさらに別の実施形態において、サンプルフィルターとクロマトグラフィー片の第２端部との間に配置される結合体パッドが提供され、そしてこのクロマトグラフィー片は、結合体を放出するような、サンプルフィルターから結合体パッドへの流れを支持する。

【００３６】

本発明のさらなる実施形態において、結合体パッドが提供され、この結合体パッドは、サンプルフィルターの下の位置に存在し、そしてサンプルフィルターおよびクロマトグラフィー片と毛管接触し、サンプルフィルターから結合体パッドを通ってクロマトグラフィー片へ流体が流れることを可能にする。

【００３７】

本発明の１つの実施形態において、クロマトグラフィー膜、接着層および接着層の裏材（ｂａｃｋｉｎｇ）を備える、クロマトグラフィー片が提供される。

【００３８】

本発明の１つの実施形態において、ニトロセルロース製のクロマトグラフィー膜が提供される。

【００３９】

本発明のさらに別の実施形態において、Ｓｐｅｃｔｒａｌ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｉｎｃ．から入手可能なＳ／Ｇとコードされる、赤血球／血漿分離膜であるサンプルフィルターが提供される。

【００４０】

本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施するための試験片の製造方法がさらに提供され、この製造方法は、以下：（ａ）第１端部および第２端部を有するクロマトグラフィー片を提供する工程；および（ｂ）クロマトグラフィー片の第１端部の近傍に上側表面および下側表面を備えるサンプルフィルターを提供する工程、を包含し、ここで、サンプルフィルターの下側表面は、クロマトグラフィー片と毛管接触し、流体の流れをサンプルフィルターとクロマトグラフィー片との間で毛管接触させ、ここで試験片は、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片の第２端部までの流体のラテラルフローを支持する。

【００４１】

本発明の別の実施形態において、本明細書中に記載される試験片の製造方法がさらに提供され、この製造方法は、さらに以下：（ｃ）サンプルフィルターとクロマトグラフィー片との間にサンプルパッドを配置する、工程を包含し、ここでサンプルパッドが、サンプルフィルターおよびクロマトグラフィー片と毛管接触し、そして流体は、毛管力または浸透圧によって、サンプルフィルターからサンプルパッドを通ってクロマトグラフィー片まで流れ得る。

【００４２】

本発明の別の実施形態において、本明細書中に記載される試験片の製造方法がさらに提供

され、この製造方法は、さらに以下：（ｄ）クロマトグラフィー片上に結合体パッドを提供する工程、を包含し、ここで結合体パッドがクロマトグラフィー片と毛管接触され、そして流体は、毛管力または浸透圧によって、結合体パッドを通ってクロマトグラフィー片へ流れ得る。

【００４３】

本発明の別の実施形態において、本明細書中に記載される試験片の製造方法がさらに提供され、この製造方法は、さらに以下：（ｅ）結合体パッド上に試薬パッドを提供する工程、を包含し、ここで、試薬パッドは、結合体パッドと毛管接触され、そして試薬パッドから結合体パッドへの流体流れを可能にする。

【００４４】

本発明のさらなる実施形態において、本明細書中に記載される試験片の製造方法が提供され、この製造方法は、さらに以下：（ｆ）サンプルフィルターとクロマトグラフィー片との間に選択性膜を提供する工程、を包含し、ここで選択性膜は、サンプルフィルターおよびクロマトグラフィー片と毛管接触され、そしてサンプルフィルターからクロマトグラフィー片への流体の流れを可能にする。

【００４５】

本発明の別の実施形態において、サンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施するためのサンプル中の流体から細胞を分離する方法をまた提供し、この方法は以下：（ａ）本明細書中に記載される試験片を提供する工程；および（ｂ）サンプルフィルター上にサンプルを適用する工程、を包含する。

【００４６】

本発明の別の実施形態において、細胞および流体を含むサンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローを実施する方法をさらに提供し、この方法は以下：（ａ）本明細書中に記載される試験片を提供する工程；（ｂ）サンプルフィルター上にサンプルを適用する工程；（ｃ）サンプルフィルターからクロマトグラフィー片へ、そしてクロマトグラフィー片の第２端部に向かう流体の流れを可能にする工程；（ｄ）結合体パッドにおいて結合体を放出するための緩衝液を適用する工程；（ｅ）サンプル中の分析物に向かう結合体の流れを可能にし、複合体を形成する工程；および（ｆ）複合体の存在を検出する工程、を包含する。

【００４７】

本発明の別の実施形態において、上記のラテラルフローを実施する方法をさらに提供し、この方法はさらに以下：（ｇ）形成された複合体の量を定量する工程を包含する。

【００４８】

本発明のこれらおよび他の、局面および実施形態は、より詳細に特定の手順または組成物を記載する、本明細書中に示される以下の発明の詳細な説明、添付の図面および種々の参考を参照する際に、明らかになる。

【００４９】

（発明の詳細な説明）

本発明の試験片が、効果的かつ効率的にサンプル中の流体から細胞全体を分離し得、そして定性的および定量的にサンプル中の分析物を検出するために使用し得ることが発見されている。本発明の試験片は、治療診断（例えば、医院または診療所において）デバイスの要点として商業的に使用可能である。本明細書中に記載されるデバイスおよび方法は、例えば、感染因子（ＨＩＶおよびＨＣＶを含む）ならびに他の分子（例えば、デオキシピロジノリン、ヒト血清アルブミン、薬物の乱用、前立腺特異的抗原のようなタンパク質マーカー、乳酸デヒドロゲネートのような腎疾患タンパク質、Ｎ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミン、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのような妊娠関連ホルモンまたは受精能関連ホルモンおよび尿路感染のマーカー）の検出に有用である。治療薬物、ホルモン、前立腺特異的抗原のような癌マーカー、心臓マーカー（トロポニンＩ、トロポニンＴ、ＣＫＭＢ）およびα－フェトプロテインのような血液に含まれる分析物の決定は、本発明に特に適している。さらに、このサンプルは、例えば、全血であり得る。したがって、本発明のデバイスお

よび方法は、特定の分析物の存在について種々の流体（例えば、尿、唾液、汗または粘液）をアッセイするために適切であるが、血液が試験流体（例えば、指の穿刺（ｆｉｎｇｅｒ　ｓｔｉｃｋ）のような方法によって回収される場合の小さいサンプル容量を含む）であるアッセイに特に適切である。

【００５０】

本明細書および請求項において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、その内容が明らかに他を示さない限り、複数の参照を含む。故に、例えば、「サンプルフィルター（ａ　ｓａｍｐｌｅ　ｆｉｌｔｅｒ）」は、１つ以上のサンプルフィルターを含む。

【００５１】

種々の例示的な図および方法への参照が、本明細書中でなされている。本明細書中に記載されるデバイスの構成要素が異なって構成され得ること、またはこの構成要素の異なる組合せが、使用され得ることが理解されるべきである。同様に、本方法の工程の順序が、これらの例から変わり得ることが理解されるべきである。

【００５２】

図面を参照して、図１は、本発明の試験片の１つの実施形態の側面図である。ポートＩ（１）は、サンプルフィルター（２）上へのサンプルの適用のためのものであり、これは、サンプルパッド（３）および（必要に応じて）さらなる膜（４）（これは、選択性膜であり得る）の上に位置する。このサンプルフィルターは、任意の適切な材料、例えば、流体から細胞（例えば、血球）を濾過し得る疎水性材料で作られ得る。市販のフィルターまたは膜（例えば、ガラス微小繊維フィルター（Ｗｈａｔｍａｎ、Ｋｅｎｔ、ＵＫまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＰｌａｓｍａＳｅｐ（登録商標）（Ｗｈａｔｍａｎ）および／またはＳｐｅｃｔａｌ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓから入手可能なＣ／Ｓ膜、Ｃ／Ｑ膜、Ｓ／Ｇ膜などのようなフィルター）が、本明細書中に記載されるデバイスおよび方法における使用に適応され得る。好ましい実施形態において、このサンプルフィルターは、Ｓｐｅｃｔａｌ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＵＳＡ，Ｗｈｉｔｅｓｔｏｎｅ，ＶＡ，ＵＳＡからの１つ以上のＳ／Ｇ膜を備える。サンプルフィルターの選択は、本明細書中に記載の教示を使用して、例えば、所望の流速および／または分離能を達成するように作製され得る。サンプル適用ゾーンは、疎水性材料であっても親水性材料であってもよい。特定の実施形態において、試験片システムへのサンプルの吸収を促進するために親水性である。本明細書中に記載される任意のデバイスにおいて、１つより多くのサンプルフィルターが、使用され得る。

【００５３】

選択性膜（４）は、クロマトグラフィー片（９）上に位置し得、クロマトグラフィー片（９）は、必要に応じて、接着層（１１）および接着層（１１）のためのプラスチック裏材（１２）を備え得る多層化裏材パッド（１０）によって支持される。代表的には、この裏材は、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンまたは他の非吸収性疎水材料のような疎水性の無孔の材料（この上にこのデバイスの吸収剤部分が置かれる）である。適切な疎水性材料の限定的でない例としては、ポリテトラフルオロエチレンおよびパーフルオロエチレンおよびシラン化剤のような疎水性材料で表面処理された材料が挙げられる。

【００５４】

吸収剤パッド（５）がまた図１に示される。吸収剤パッド（５）は、ポートＩ（１）に近接して、好ましくはクロマトグラフィー片（９）上に位置する。吸収剤パッドは、好ましくは、親水性であり、任意の数の材料（セルロース、乾燥剤で処理されたセルロースおよび界面活性剤で処理された多孔性ポリマーを含む）に由来し得る。市販の材料（例えば、Ｗｈａｔｍａｎから入手可能な材料）が、本明細書中に記載のデバイスおよび方法において使用され得る。

【００５５】

サンプルまたは緩衝液のような試薬のいずれかをサンプルフィルター（２）上に適用するためのポートＩＩ（６）は、クロマトグラフィー片（９）の他方の端部にある。緩衝液パ

ッド（７）は、一般的に、上のサンプルフィルター（２）と下の結合体パッド（８）との間に置かれる。結合体パッド（８）は、好ましくはクロマトグラフィー片（９）と毛管接触（ｃａｐｉｌｌａｒｙ　ｃｏｎｔａｃｔ）している。

【００５６】

図２は、本発明の試験片の１実施形態の平面図であり、サンプル中の分析物の検出のための例示的なイムノアッセイの構成要素の位置を示す。図２中で右から左に以下が示される：吸収剤パッド（５）；ポートＩ（１）（サンプル（１３）が好ましく置かれる）；サンプル中の分析物を捕捉するための捕捉バンド（１４）、この片側または両側は、必要に応じて、例えば、ポジティブコントロールおよび／またはネガティブコントロールの位置に対するコントロール線（１５）である。ポート２（６）および（例えば、金結合体化抗体または抗原を含む）結合体パッド（１６）は、コントロール線（１５）の左側にある。

【００５７】

結合体パッドは、例えば、疎水性または親水性の吸収剤、多孔性材料（例えば、ガラス繊維）、ポリエステルあるいは他の編まれた合成材料または編まれていない合成材料（これを通って、流体試験サンプルが流れ得る）であり得、そして１つ以上の標識された特異的結合パートナーの１つ以上の移動可能結合体を含み得る。特異的結合パートナー（例えば、抗体）は、例えば、酵素、発光団（ｆｌｕｏｒｏｆｏｒ）、放射活性同位体または直接粒子標識（例えば、金粒子または色づけされたラテックス粒子）のような検出可能標識で標識され得る。

【００５８】

図３は、本発明に従う試験片の１実施形態の平面図であり、サンプル（１３）からの流体のラテラルフローの方向（１７）および結合体パッド（８）からの結合体（１６）のラテラルフローの方向（１８）を示す。

【００５９】

図４は、本発明の試験片の別の実施形態の側面図である。この実施形態において、サンプルフィルター（２）は、結合体パッド（８）の上に置かれて示され、そしてこの結合体パッド（８）は、クロマトグラフィー片（９）上に置かれて示され、このクロマトグラフィー片（９）は、必要に応じて、裏材（１９）および接着層（１１）ならびに接着層（１１）のためのプラスチック裏材（１２）を有し得る。吸収剤パッド（５）は、クロマトグラフィー片（９）の反対の端部に置かれて示される。

【００６０】

本明細書中に記載される試験片および試験片を構成する構成要素の全体サイズは、大きく変動し得る。特定の実施形態において、クロマトグラフィー片は、長さ約０．１～５ｃｍの間（またはそれらの間の任意の値）、好ましくは約０．５～２．５ｃｍの間（またはそれらの間の任意の値）、およびさらにより好ましくは長さ約１ｃｍである。明白であるように、この片の構成要素は、従って、例えば、１ｃｍのクロマトグラフィー片内のサイズに作られ、サンプルフィルターは、幅約５～１０ｍｍ（またはそれらの間の任意の値）および長さ１０～２０ｍｍ（またはそれらの間の任意の値）であり得る。

【００６１】

このような試験片を作製する方法は、本明細書中の下記（例えば、実施例を参照のこと）、利用可能な参考文献および本明細書中に援用される参考文献中に示される。例えば、本明細書中に記載される任意の試験片は、第１端部および第２端部を有するクロマトグラフィー片を提供すること；およびサンプルフィルターの下側表面がクロマトグラフィー片と毛管接触し、そしてこのサンプルフィルターが、（ｉ）サンプル中の流体からサンプル中の細胞を分離し得、（ｉｉ）流体がクロマトグラフィー片を通過することを可能にし、そして（ｉｉｉ）クロマトグラフィー片の第２端部に向かっての流体のラテラルフローを促進するように、上側表面および下側表面を有するサンプルフィルターを提供することによって作製され得る。存在する場合、サンプルパッドは、好ましくはサンプルパッドが、サンプルフィルターおよびクロマトグラフィー片と毛管接触し、そして流体が毛管力または浸透圧力によってサンプルフィルターからサンプルパッドを通ってクロマトグラフィー片

への流動するように、例えば、サンプルフィルターとクロマトグラフィー片との間に置かれ得る。同様に、結合体パッドもまた、結合体パッドがクロマトグラフィー片と毛管接触し、そして流体が毛管力または浸透圧力によって結合体パッドを通ってクロマトグラフィー片への流動するように、一般的にクロマトグラフィー片上に提供され得る。試薬パッドもまた、試薬パッドが結合体パッドと毛管接触し、そして試薬パッドから結合体パッドへの流体の流動を可能にするように、例えば、結合体パッド上に提供され得る。さらに、選択性膜は、選択性膜がサンプルフィルターおよびクロマトグラフィー片と毛管接触し、そしてサンプルフィルターからクロマトグラフィー片への流体の流動を可能にするように、例えば、サンプルフィルターとクロマトグラフィー片との間に提供され得る。

【００６２】

（例えば、サンプル中の分析物の検出のためのラテラルフローアッセイの実施について、サンプル中の流体から細胞を分離するための試験片を使用する方法もまた、本明細書中に記載される。代表的には、サンプル（例えば、流体および細胞を含むサンプル）が、本明細書中に記載される任意の試験片に適用され、そしてこの片が、例えば、サンプルフィルターからクロマトグラフィー片への流体の流動およびクロマトグラフィー片の第２端部へ向かっての流体の流動を可能にし；緩衝液を適用して、結合体パッド中の結合体を放出させ；サンプル中の分析物に向かって結合体を流動させて、複合体を形成させ；そして複合体の存在を検出することによって、サンプル中の流体から細胞を分離する。特定の実施形態において、定量的な量（ｑｕａｎｔｉｆｙｉｎｇ　ａｍｏｕｎｔ）の複合体が形成された。

【００６３】

故に、本発明のラテラルフローアッセイは、例えば、以下のように実施され得る：

（１）血清または血漿を、サンプルフィルターにサンプルを適用することによって、ポート１に添加される血液サンプルから得られる。この膜は、代表的には、クロマトグラフィー片上に直接にか、またはサンプルパッドを通ってのいずれかで、液体を通過させるが、血球（例えば、約６ミクロン）を保持する孔（例えば、約５ミクロン以下）を有する。上記のように、この膜は、好もしくはＳ／Ｇ膜（Ｓｐｅｃｔａｌ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）である。

（２）血清試料または血漿試料を、予め被覆した化学物質との反応領域（捕捉レーンおよびコントロールレーン）に流す。

（３）試料中の抗原または抗体を、反応領域（捕捉レーンおよびコントロールレーン）において対応する試薬と反応させ、免疫複合体１を形成させる。

（４）結合体放出緩衝液またはサンプル（いくつかの試験において）を、ポート２に添加する。この液体（緩衝液またはサンプル）が、金結合体化試薬（抗原または抗体）を溶解し、次いで、この試薬は、反応領域（捕捉レーンおよびコントロールレーン）に向かって流れ、そして免疫複合体１と反応する。試料が、試験された品目についてポジティブである場合、コントロールバンドおよび捕捉バンド領域において、色彩に富むバンドが形成される。

（５）ポート１に近い端部に位置づけられた吸収剤が、クロマトグラフィー片によって吸収されなかった過剰の液体を吸収する。

【００６４】

以下の実施例は、本発明のよりよい理解を容易にする例示を目的として提供され、決して本発明を制限するように意図されない。

【実施例】

【００６５】

（実施例１）

この例において、クロマトグラフィー片は、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（ｈｔｔｐ:／／ｗｗｗ．ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ．ｃｏｍ；ｔｅｃｈ　ｓｅｒｖｉｃｅ@ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ．ｃｏｍ）からのニトロセルロース免疫クロマトグラフ試験片である。この試験片は、ＰｒａｘＳｙｓ　ＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃに対する米国特許第６

，１３６，６１０号（「’６１０特許」）（２０００年１０月２４日発行）（「Ｍｅｔｈｏｄ ａｎｄ ａｐｐａｒａｔｕｓ ｆｏｒ ｐｅｒｆｏｒｍｉｎｇ ａ ｌａｔｅｒａｌ ｆｌｏｗ ａｓｓａｙ」と題され、その内容（’６１０特許に参考として援用される資料を含む）は、全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されるカートリッジに組み立てられた。両面接着テープ（ｄｏｕｂｌｅ ａｄｈｅｓｉｖｅ ｔａｐ）は、ポリエステルで作られ、Ｇ＆Ｌ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｃｕｔｔｉｎｇから入手した。裏材パッドは、プラスチックで作られ、Ｇ＆Ｌ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｃｕｔｔｉｎｇから入手した。

【００６６】

サンプルフィルターは、血球／血漿分離膜Ｓ／Ｇで作製された。このサンプルフィルターをＳｐｅｃｔａｌ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｉｎｃ．（１３５－２ Ｔｈｅ Ｗｅｓｔ Ｍａｌｌ，Ｔｒｏｎｔｏ，Ｏｎｔａｒｉｏ Ｍ９Ｃ １Ｃ２，Ｃａｎａｄａ）から入手し、そしてこれは、ｖａｎ Ｏｕｄｈｅｕｓｄｅｎ，Ａ．Ｐ．Ｍ．およびＲｏｅｓｉｎｋ，Ｈ．Ｄ．Ｗ．，Ａｎｎ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２８：５５－５９（１９９１）；およびＸ－Ｆｌｏｒ Ｂ．Ｖ．およびＰｒｉｍｅｃａｒｅ Ｂ．Ｖ．に譲渡された米国特許第５，２４０，８６２号（「’８６２特許」）（１９９３年８月３１日発行）（「Ｐｒｏｃｅｓｓ ａｎｄ ｄｅｖｉｃｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｂｏｄｙ ｆｌｕｉｄ ｆｒｏｍ ｐａｒｔｉｃｕｌａｔｅ ｍａｔｅｒｉａｌｓ」と題される）に記載されている。使用される他の構成要素は、産業において慣習的であり、任意の適切な売手に注文し得る。例えば、コロイド状の金は、Ｂｒｉｔｉｓｈ ＢｉｏＣｅｌｌ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（Ｇｏｌｄｅｎ Ｇａｔｅ，Ｔｙ Ｇｌａｓｓ Ａｖｅｎｕｅ，Ｃａｒｄｉｆｆ ＣＦ４ ５ＤＸ，Ｗａｌｅｓ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄａｍ）に注文し得る。

【００６７】

このサンプルパッドおよび緩衝液パッドを、親水性材料、Ｃｙｔｏｓｅｐ（これは、Ｐａｌｌ Ｓｐｅｃｉａｌｔｙ Ｍａｔｅｒｉａｌｓから入手された）で作製した。

【００６８】

結合体パッドを、結合体放出パッド（Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｃ．（４０１ Ｗｅｓｔ Ｍｏｒｇａｎ ｒｏａｄ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ ４８１０８－９１０９，Ｕ．Ｓ．Ａ．）によって製造され、Ｐａｌｌ Ｓｐｅｃｉａｌｔｙ Ｍａｔｅｒｉａｌｓから入手されるガラスの疎水性材料）から作製した。

【００６９】

吸収剤を、Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｃ．から入手された親水性材料で作製した。

【００７０】

（実施例２）

この実施例において、実施例１のサンプルフィルターおよび結合体パッドを、それぞれニトロセルロースクロマトグラフ膜の上に直接置き、そして別のサンプルフィルターを結合体パッドに直接置いた（介在サンプルパッド、選択性膜および緩衝液パッドを除く、構成中の全部が図１に示される）。この構成において、全血を、両方の位置においてサンプルフィルターに適用し、そしてこのアッセイを進行させた。血漿分離または血清分離は、同様に効果的かつ効率的であり、サンプル流体は、長さ１ｃｍのクロマトグラフィー片について反応領域（すなわち、捕捉線）内に約９０～１５０秒で流れた。

【００７１】

（実施例３）

この実施例において、サンプルパッドを、サンプルフィルターの下に加え、そして緩衝液放出パッドを、結合体パッドの上に加えた。血漿分離または血清分離は、同様に効果的かつ効率的であり、サンプル流体は、長さ１ｃｍのクロマトグラフィー片について反応領域（すなわち、捕捉線）内に約９０～１５０秒で流れた。

【００７２】

（実施例４）

この実施例では、血液サンプルを、抗凝固剤有りまたは無しで、実施例１のサンプルフィルターにアプライした。血漿または血清の分離は、１ｃｍの長さであるクロマトグラフィー片について、約９０～１５０秒の間、サンプル流体は反応領域（すなわち、捕捉ライン（ｃａｐｔｕｒｅ　ｌｉｎｅ））へ流動し、同様に有効かつ効率的であった。血液サンプルが抗凝固剤を含まない場合、サンプルフィルターを抗凝固剤で前処理する必要はない。実際、抗凝固剤でのサンプルフィルターの前処理は、サンプルフィルターに損傷を与え、血球の漏出を引起す。

【００７３】

（実施例５）

この実施例では、単層のサンプルフィルターの使用を、二層のサンプルフィルターの使用と比較した。単層のサンプルフィルターの使用は、２つのサンプルフィルターの共用よりも、より速い流速を生じることを見出した。

【００７４】

（実施例６）

この実施例では、サンプルフィルターのサイズを変更して流速を最適化した。５０～１５０μｌの血液サンプルの各サンプルについて、見出した最適なサイズは、７ｍｍ（幅）×１３ｍｍ（長さ）であった。相対的に、サンプルフィルターのサイズが大きくなるにつれて、流動時間は短くなった。

【００７５】

（実施例７）

この実施例では、緩衝液（５０～１５０μｌ）を、血液サンプルをサンプルフィルターにアプライした約３０～６０秒後に添加した。流動時間（すなわち、サンプルの適用の時間から流体が捕捉ラインに到達するまでの時間）は減少し、そしてバックグラウンドシグナルを低下させた。

【００７６】

（実施例８）

抗ＨＩＶ試験。ＥＩＡ抗ＨＩＶアッセイで確認した患者の血液標本を、抗凝固剤を用いて収集した。血漿を血液サンプルのアリコートから収集した。１００μｌの血液および５０μｌの血漿を、抗ＨＩＶアッセイ片のポート１にアプライした。５０μｌの緩衝液を、血液サンプルをアプライした２分後に、ポート１へと添加した。約２０分のインキュベーション時間の後、ＲｅＬＩＡ装置を走査し、そして捕捉バンドにより生じた密度を読取った。Ｓ／ＣＯのＣＶ％は７．８％であった。

【００７７】

本発明のこれらの局面の全ては、別々にまたは組合わせて実施され得る。さらに、本発明の好ましい実施形態は、いくらか詳細に記載されているが、明らかな改変が本発明の精神および範囲を逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【００７８】

【図１】図１は、本発明の試験片の１つの実施形態の側面図である。

【図２】図２は、本発明の試験片の１つの実施形態の上面図であり、サンプル中の分析物の検出のためのイムノアッセイの成分の配置を示す。

【図３】図３は、本発明の試験片の１つの実施形態の上面図であり、流体のラテラルフローを示す。

【図４】図４は、本発明の試験片の別の実施形態の側面図である。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008933 A2

(51) International Patent Classification⁷: G01N

(21) International Application Number: PCT/US02/23164

(22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/306,660 18 July 2001 (18.07.2001) US

(71) Applicant and
(72) Inventor: ZHOU, Siliang [US/US]; 2711 Markham Court, Hayward, CA 94542 (US).

(74) Agents: ROBINS, Roberta, L. et al.; Robin & Pasternak LLP, Suite 180, 545 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, BE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

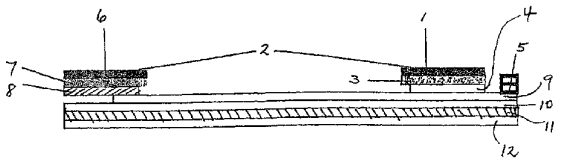
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/008933 A2

(54) Title: A TEST STRIP FOR A LATERAL FLOW ASSAY FOR A SAMPLE CONTAINING WHOLE CELLS



(57) Abstract: A test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid is provided, as well as methods for making and using the test strip. This test strip is commercially usable, for example, in a diagnostic device at a point of care for detection of analytes in whole blood.

A TEST STRIP FOR A LATERAL FLOW ASSAY FOR A SAMPLE CONTAINING WHOLE CELLS

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to the field of medicine and diagnostics. In particular, the invention relates to lateral flow assay for the detection of an analyte in a sample containing whole cells, such as blood cells in a blood sample.

BACKGROUND OF THE INVENTION

PraxSys BioSystems developed ReLIA Technology, as described in U.S. Patent No. 6,136,610. The PraxSys device contains a test strip that is not suitable for use when the sample to be analyzed contains whole cells, such as a blood sample containing red blood cells. Therefore, there remains an unmet need for a test strip that can be used for detection of an analyte in a sample containing whole cells.

U.S. Patent No. 5,240,862, describes blood separation materials. However, this separation methodology requires the use of a separation membrane and a collection membrane in a device, removal of the separation membrane from the collection membrane, and use of the collection membrane for further analysis. This methodology is cumbersome and is not suitable for use in a lateral flow assay.

Thus, there also remains a need for simpler methods for detection of an analyte in a sample containing whole cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

To address the unmet needs and to overcome the disadvantages of the prior art test strip, there is provided herein a test strip that is commercially usable for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid. In certain embodiments, the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; and (b) a sample filter having an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip; where the sample filter is capable of separating the cells in the sample from fluid in the sample and allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and where

the test strip supports lateral flow of the fluid from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

There is provided in another embodiment of the present invention, a test strip as described herein, where the sample that can be analyzed is a sample of body fluids. In further embodiments of the present invention, the sample is a blood sample, a saliva sample, a urine sample, sample taken from lymphatic tissues, a sample from a spinal tap, or a sample taken from a peritoneal cavity, synovial fluid from a joint, or fluid from lungs.

In a further embodiment of the present invention, there is provided the test strip, as above, where the sample filter comprises a surface that contacts the sample and the surface is hydrophilic.

In as yet another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; and (b) a sample filter having an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip and where the sample filter comprises pores of varying pore sizes to allow the cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

There is further provided in another embodiment of the present invention, a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; and (b) a sample filter having an upper surface and a lower surface, and first and second pores, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip, the first pores are closer to the upper surface of the sample filter and the second pores are closer to the lower surface of the sample filter, the first pores comprising a first pore size and the second pores having a second pore size, and where the first pore size is larger than the second pore size, the sample filter allows

the cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

In as yet another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains red blood cells, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; and (b) a sample filter having an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip; and where the sample filter is capable of separating the red blood cells in the sample from fluid in the sample, and allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and the test strip supports lateral flow of the fluid from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

There is provided in as yet another embodiment of the present invention, a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains red blood cells, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; and (b) a sample filter having an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip and where the sample filter comprises pores of varying pore sizes to allow the red blood cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention, a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains red blood cells, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; and (b) a sample filter having an upper surface and a lower surface and first and second pores, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip, the first pores are closer to the upper surface of the sample filter and the second pores are closer to the lower surface of the sample filter, the

first pores comprising a first pore size and the second pores comprising a second pore size, and where the first pore size is larger than the second pore size, the sample filter allows the cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

In still another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad; and where the sample filter is capable of separating the cells in the sample from fluid in the sample and allows the fluid to pass through, the sample pad also allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

There is provided in another embodiment of the present invention, a test strip as described herein, where the sample is a blood sample and the cells are blood cells.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad, and where the sample filter comprises pores of varying pore sizes to allow the cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass

through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface and first and second pores, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad, the first pores are closer to the upper surface of the sample filter and the second pores are closer to the lower surface of the sample filter, the first pores comprising a first pore size and the second pores comprising a second pore size, and where the first pore size is larger than the second pore size, the sample filter allows the cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

In as yet another embodiment of the present invention, there is provided a test strip as described herein, further comprising a selective membrane, where the selective membrane is positioned under the sample filter. In an embodiment of the present invention, there is provided the selective membrane, which lies on top of the sample pad. In another embodiment of the present invention, the selective membrane lies on top of the chromatographic strip. In any event, the selective membrane is in capillary contact with the sample filter and the sample pad or the chromatographic strip to allow fluid to pass through the selective membrane under capillary or osmotic forces. The selective membrane contains an agent that can selectively bind to a component in the sample to effectively remove the component from the assay environment.

There is further provided, in another embodiment of the present invention, one or more other filters or membranes between the sample filter and the chromatographic strip for one or more purposes, provided that the additional one or more membranes do not impair the capillary or osmotic flow of fluid from the sample filter to the chromatographic

strip, and provided that the height of the combined filters or membranes does not impair the ability of the test strip to be fitted in a cassette to be read in an instrument.

In an embodiment of the present invention, the selective membrane as above contains an agent that is an antibody, an antigen, a metabolite, a hormone, an enzyme, a virus, a prion, or parts thereof, or an agent that binds to such.

In as yet another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains blood cells, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad, and where the sample filter is capable of separating the red blood cells in the sample from fluid in the sample and allows the fluid to pass through, the sample pad also allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

There is also provided in a further embodiment of the present invention, a test strip as described herein, where the sample pad comprises a surface that contacts the fluid, and the surface is hydrophilic.

There is further provided in another embodiment of the present invention, a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains red blood cells, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad, and where the sample filter comprises pores of varying pore sizes to allow the red

blood cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

In as yet another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains blood cells, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface and first and second pores, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad, the first pores are closer to the upper surface of the sample filter and the second pores are closer to the lower surface of the sample filter, the first pores comprising a first pore size and the second pores comprising a second pore size, and where the first pore size is larger than the second pore size, the sample filter allows the red blood cells from the sample to be retained in the sample filter and the fluid in the sample to pass through the sample filter; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

Further, there is provided in another embodiment of the present invention, a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated close to the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad; (d) a conjugate pad situated at or close to the second end of the chromatographic strip, where the conjugate pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the conjugate pad is in capillary contact with the chromatographic strip; (e) a reagent

pad comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the reagent pad is in capillary contact with the upper surface of the conjugate pad; and (f) an absorbent pad situated at the first end of the chromatographic strip and to a side of the sample pad that is away from the conjugate pad, where the absorbent pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and where the sample filter is capable of separating the cells from the fluid in the sample and the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the conjugate pad.

Moreover, there is provided in one embodiment of the present invention, the test strip as described herein, where reagent pad is suitable for application of a reagent, such as a buffer, to release the conjugate from the conjugate pad.

In a further embodiment of the present invention, there is provided a reagent pad that may be the same or different from the sample filter. Where the reagent pad is the same as the sample filter, a sample can be applied to the reagent pad to release the conjugate from the conjugate pad, but only if the sample does not react with the conjugate to form any complexes that would impair the capillary or osmotic flow of the fluid onto the chromatographic strip for conduct of the assay.

In another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains whole cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated at the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad and where the sample filter comprises varying pore sizes and allows the cells to be retained in the sample filter and the fluid to pass through the sample filter; (d) a conjugate pad situated at the second end of the chromatographic strip, where the conjugate pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the conjugate pad is in capillary contact with at least a portion of the chromatographic strip; (e) a reagent pad comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the reagent pad is in capillary contact with the upper surface of the conjugate pad; and (f) an absorbent pad

situated at the first end of the chromatographic strip and to a side of the sample pad that is away from the conjugate pad, where the absorbent pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the conjugate pad.

Moreover, in another embodiment of the present invention, there is provided a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains whole cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated at the first end of the chromatographic strip, where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface and first and second pores, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad, the first pores are closer to the upper surface of the sample filter and the second pores are closer to the lower surface of the sample filter, the first pores comprising a first pore size and the second pores comprising a second pore size, and where the first pore size is larger than the second pores size, the sample filter allows the cells to be retained in the sample filter and the fluid to pass through the sample filter; (d) a conjugate pad situated at the second end of the chromatographic strip, where the conjugate pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the conjugate pad is in capillary contact with at least a portion of the chromatographic strip; (e) a reagent pad comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the reagent pad is in capillary contact with the upper surface of the conjugate pad; and (f) an absorbent pad situated at the first end of the chromatographic strip and to a side of the sample pad that is away from the conjugate pad, where the absorbent pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and where the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the conjugate pad.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention, a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains blood cells and fluid, where the test strip comprises: (a) a first membrane that comprises a chromatographic strip, where the chromatographic strip comprises a first end and a second end; (b) a sample pad situated at the first end of the chromatographic strip,

where the sample pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the sample pad is in capillary contact with the chromatographic strip; (c) a sample filter comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad and the sample filter is capable of separating red blood cells from fluid in the sample; (d) a conjugate pad situated at the second end of the chromatographic strip, where the conjugate pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the conjugate pad is in capillary contact with at least a portion of the chromatographic strip; (e) a reagent pad comprising an upper surface and a lower surface, where the lower surface of the reagent pad is in capillary contact with the upper surface of the conjugate pad; and (f) an absorbent pad situated at the first end of the chromatographic strip and to a side of the sample pad that is away from the conjugate pad, where the absorbent pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and where the test strip is capable of supporting lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the conjugate pad.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention, a test strip as described herein, further comprising: (d) a conjugate pad situated between the sample pad and the second end of the chromatographic strip, where the conjugate pad comprises an upper surface and a lower surface, and the lower surface of the conjugate pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and (f) an absorbent pad situated at the second end of the chromatographic strip, where the absorbent pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and where the test strip is capable of supporting lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the conjugate pad.

There is further provided in another embodiment of the present invention, a test strip as described herein adapted for conduct of an immunoassay on the chromatographic strip for detection of an analyte in a sample containing cells and fluid. In an aspect of the present embodiment, the test strip comprises a conjugate that can be released from the conjugate pad upon application of fluid to the conjugate pad, where the conjugate is capable of combining with the analyte to be detected to form a detectable signal, indicating the presence of the analyte. In another aspect of the present invention, the conjugate comprises a first binding agent that is capable of binding to the analyte.

Examples of the first binding agent include an antibody and an antigen, if the analyte is an antibody. In a further aspect of the present embodiment, the conjugate comprises a second binding agent, where the second binding agent comprises a detectable marker and binds either to the first binding agent or to the analyte.

In a further embodiment of the present invention, the detectable signal can be quantified. In such an instance, the immunoassay of the present invention is a quantitative immunoassay.

In yet another embodiment of the present invention, there is provided a test strip as described herein, where the chromatographic strip supports the capillary flow of fluid from the sample filter situated close to the first end of the chromatographic strip to the second end of the chromatographic strip, and the capillary flow of conjugate, released from the conjugate pad, from the second end of the chromatographic strip towards the first end of the chromatographic strip, allowing the conjugate to come into contact with the fluid from the sample to form an immobilized complex, and allowing the detection of the complex.

There is also provided in yet another embodiment of the present invention, a test strip as described herein, where the conjugate pad is situated in any appropriate location on the chromatographic strip to allow and facilitate the conduct of the immunoassay.

In yet another embodiment of the present invention, there is provided a conjugate pad that is situated between the sample filter and the second end of the chromatographic strip, and the chromatographic strip supports the flow of fluid from the sample filter to the conjugate pad to release the conjugate.

In a further embodiment of the present invention, there is provided a conjugate pad that is situation under the sample filter and is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip and allows the flow of fluid from the sample filter through the conjugate pad to the chromatographic strip.

There is also provided in one embodiment of the present invention, a chromatographic strip that comprises a chromatographic membrane, an adhesive layer and a backing for the adhesive layer.

In an embodiment of the present invention, there is provided a chromatographic membrane that is made of nitrocellulose.

In yet another embodiment of the present invention, there is provided a sample filter that is a blood cell/plasma separation membrane encoded S/G available from Spectral Diagnostics Inc.

There is further provided in another embodiment of the present invention, a method of making a test strip for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, comprising the steps of: (a) providing a chromatographic strip having a first end and a second end; and (b) providing a sample filter that comprises an upper and a lower surface close to the first end of the chromatographic strip, where the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip to allow flow of fluid capillary contact between the sample filter and the chromatographic strip, where the test strip supports lateral flow of fluid from the sample filter to the second end of the chromatographic strip.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention, the method of making a test strip as described herein, further comprising the step of: (c) placing a sample pad between the sample filter and the chromatographic strip, where the sample pad is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip, and fluid can flow from the sample filter through the sample pad to the chromatographic strip by capillary or osmotic forces.

There is further provided in another embodiment of the present invention, the method of making a test strip as described herein, further comprising the step of: (d) providing a conjugate pad on the chromatographic strip, where the conjugate pad is in capillary contact with the chromatographic strip, and fluid can flow through the conjugate pad to the chromatographic strip by capillary or osmotic forces.

There is additionally provided in another embodiment of the present invention, the method of making a test strip as described herein, further comprising the step of (e) providing a reagent pad on the conjugate pad, where the reagent pad is in capillary contact with the conjugate pad and allows the flow of fluid from the reagent pad to the conjugate pad.

In a further embodiment of the present invention, there is provided the method of making a test strip as described herein, further comprising the step of (f) providing a selective membrane between the sample filter and the chromatographic strip, where the

selective membrane is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip and allows the flow of fluid from the sample filter to the chromatographic strip.

There is also provided in another embodiment of the present invention, a method of separating cells from fluid in a sample for conduct of a lateral flow assay for detection of an analyte in the sample, comprising the steps of: (a) providing a test strip as described herein; and (b) applying the sample on the sample filter.

There is further provided in another embodiment of the present invention, a method of conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, comprising the steps of: (a) providing a test strip as described herein; (b) applying the sample on the sample filter; (c) allowing flow of fluid from the sample filter to the chromatographic strip and towards the second end of the chromatographic strip; (d) applying a buffer to release the conjugate in the conjugate pad; (e) allowing flow of the conjugate towards the analyte in the sample to form a complex; and (f) detecting presence of the complex.

There is additionally provided, in another embodiment of the present invention, a method of conducting a lateral flow assay as above, further comprising the step of: (g) quantifying amount of complex formed.

These and other aspects and embodiments of the invention will become evident upon reference to the following detailed description, attached figures and various references set forth herein that describe in more detail certain procedures or compositions.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a side view of one embodiment of the test strip of the present invention.

FIG. 2 is a top view of one embodiment of the test strip of the present invention showing placements of the components of an immunoassay for detection of an analyte in a sample.

FIG. 3 is a top view of one embodiment of the test strip of the present invention showing the lateral flow of fluid.

FIG. 4 is a side view of another embodiment of the test strip of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It has been discovered that the test strip of the present invention can efficiently and effectively separate whole cells from fluid in a sample and can be used to detect an analyte in the sample qualitatively and quantitatively. The test strip of the present invention is commercially usable as a point of care diagnostic (*e.g.*, in a doctor's office or clinic) device. The devices and methods described herein are useful, for example, for the detection of infectious agents, including HIV and HCV as well as other molecules including, for example, deoxypyrodinoline, human serum albumin, drugs of abuse, protein markers such as prostate specific antigen, kidney disease proteins such as lactate dehydrogenate, N-acetyl-.beta.-D-glucosamine, pregnancy or fertility associated hormones such as human chorionic gonadotropin and markers of urinary tract infection. The determination of blood borne analytes such as therapeutic drugs, hormones, cancer markers such as prostate specific antigen, cardiac markers (Troponin I, Troponin T, CKMB) and α-fetoprotein is particularly suited to the present invention. In addition, the sample may be, for example, whole blood. Thus, although the devices and methods of the present invention is suitable for assaying various body fluids such as urine, saliva, sweat or mucous for the presence of particular analytes, it is particularly suitable for assays in which blood is the test fluid including, for example, a small sample volume when the blood is collected by means such as a finger stick.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a sample filter" includes one or more sample filters.

Reference is made herein to various exemplary figures and methods. It is to be understood that the components of the devices described herein may be configured differently or that different combinations of the components may be used. Similarly, it is to be understood that the order of the steps of the methods may be varied from these examples.

Referring to the drawings, FIG. 1 is a side view of one embodiment of the test strip of the present invention. Port I (1) is for application of sample onto sample filter (2), which lies on top of sample pad (3) and, optionally, an additional membrane (4) which may be a selective membrane. The sample filter can be made of any suitable material, for example, a hydrophobic material capable of filtering cells (*e.g.*, blood cells) from fluids.

Commercially available filters or membranes can be adapted for use in the devices and methods as described herein, for example filters such as glass microfiber filters (Whatman, Kent, UK or Millipore), PlasmaSep® (Whatman) and/or C/S membrane, C/Q membranes, S/G membranes and others available from Spectral Diagnostics. In a preferred embodiment, the sample filter comprises one or more S/G membranes from Spectral Diagnostics USA, Whitestone, VA, USA. Selection of a sample filter can be made using the teachings described herein, for example to achieve the desired flow rate and/or separation capabilities. The sample application zone can be either hydrophobic or hydrophilic material. In certain embodiments, the sample application zone is hydrophilic to facilitate absorption of the sample into the test strip system. More than one sample filter may be used in any of the devices described herein.

The selective membrane (4) may sit on a chromatographic strip (9), which is optionally supported by a multi-layered backing pad (10) that may contain an adhesive layer (11) and a plastic backing (12) for the adhesive layer (11). Typically, the backing is a hydrophobic, non-porous material such as polystyrene, polyethylene, polypropylene or other nonbibulous hydrophobic material upon which are placed the absorbent portions of the device. Non-limiting examples of suitable hydrophobic materials include polytetrafluoroethylene and materials that are surface treated with hydrophobic materials such as perfluoroethylene and silanizing agents.

Also shown in FIG. 1, is an absorbent pad (5). Absorbent pad (5) is close to Port I (1) and preferably sits on the chromatographic strip (9). The absorbent pad is preferably hydrophilic and can be derived from any number of materials, including but not limited to cellulose, desiccant treated cellulose and surfactant treated porous polymers. Commercially available materials, such as those available from Whatman, may be used in the devices and methods described herein.

At the other end of the chromatographic strip (9) is Port II (6) for application of either sample or a reagent such as a buffer onto the sample filter (2). A buffer pad (7) is generally placed between the sample filter (2) above and a conjugate pad (8) below. The conjugate pad (8) is preferably in capillary contact with the chromatographic strip (9).

FIG. 2 is a top view of one embodiment of the test strip of the present invention showing placement of the components of an exemplary immunoassay for detection of an analyte in a sample. Shown in FIG. 2 from right to left are: absorbent pad (5); Port I (1)

where a sample (13) is preferably placed; a capture band (14) for capturing the analyte in the sample, on one or both sides of which are optionally control lines (15), for example for the placement of positive and/or negative controls. To the left of the control lines (15) is Port 2 (6) and the conjugate pad (16) containing, for example, gold conjugated antibody or antigen.

The conjugate pad may be hydrophobic or hydrophilic, for example an absorbent, porous material such as glass fiber, polyester or other woven or non-woven synthetic material through which the fluid test sample can flow and may contain one or more mobile conjugate of one or more labeled specific binding partners. The specific binding partner, for example an antibody, can be labeled with detectable label such as, for example, an enzyme, fluorofor, radio active isotope or a direct particulate label such as gold particles or colored latex particles.

FIG. 3 is a top view of one exemplary embodiment of a test strip according to the present invention showing the direction (17) of the lateral flow of fluid from the sample (13) and the direction (18) of the lateral flow of the conjugate (16) from the conjugate pad (8).

FIG. 4 is a side view of another embodiment of the test strip of the present invention. In this embodiment, a sample filter (2) is shown placed over the conjugate pad (8), and the conjugate pad (8) is shown placed over the chromatographic strip (9), which optionally may have a backing (19), and adhesive layer (11) and a plastic backing (12) for the adhesive layer (11). The absorbent pad (5) is shown placed at the opposite end of the chromatographic strip (9).

The overall size of the test strips described herein and the components making up the test strip can vary greatly. In certain embodiments, the chromatographic strip is between about .1 cm and 5 cm in length (or any value therebetween), preferably between about .5 cm and 2.5 cm (or any value therebetween), and even more preferably about 1 cm in length. As will be apparent, the components of the strip will be sized accordingly, for example, in a 1 cm chromatographic strip, the sample filter can be between about 5 to 10 mm in width (or any value therebetween) and 10 to 20 mm in length (or any value therebetween).

Methods of making such test strips are described herein (see, *e.g.*, Examples) below, in available references and references cited herein. For example, any of the test

strips described herein can be made by providing a chromatographic strip having a first end and a second end; and providing a sample filter having an upper surface and a lower surface, such that the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip and the sample filter is (i) capable of separating cells in a sample from fluid in the sample; (ii) allows the fluid to pass through to the chromatographic strip and (iii) facilitates lateral flow of fluid towards the second end of the chromatographic strip. When present, a sample pad can be placed, for example, between the sample filter and the chromatographic strip, preferably such that the sample pad is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip, and fluid flows from the sample filter through the sample pad to the chromatographic strip by capillary or osmotic forces. Similarly, a conjugate pad may also be provided, generally on the chromatographic strip, such that the conjugate pad is in capillary contact with the chromatographic strip, and fluid flows through the conjugate pad to the chromatographic strip by capillary or osmotic forces. A reagent pad may also be provided, for example, on the conjugate pad, such that the reagent pad is in capillary contact with the conjugate pad and allows the flow of fluid from the reagent pad to the conjugate pad. Further, a selective membrane may be provided, for example between the sample filter and the chromatographic strip, such that the selective membrane is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip and allows the flow of fluid from the sample filter to the chromatographic strip.

Also described herein are methods of using the test strips, for example to separate cells from fluid in a sample for conduct of a lateral flow assay for detection of an analyte in the sample. Typically, a sample (*e.g.*, one containing fluid and cells) is applied to any of the test strips described herein and the strip separates the cells from the fluid in the sample, for instance by allowing the flow of fluid from the sample filter to the chromatographic strip and towards the second end of the chromatographic strip; applying a buffer to release the conjugate in the conjugate pad; allowing the flow of the conjugate towards the analyte in the sample to form a complex; and detecting presence of the complex. In certain embodiments, quantifying amount of complex formed.

Thus, the lateral flow assay of the present invention can be performed, for example, as follows:

(1) Serum or plasma is obtained from a blood sample added into Port 1, by application of the sample to the sample filter. This membrane typically contains pores (*e.g.*, about 5 microns or less) that allow liquid to pass through, while retaining blood cells (*e.g.*, about 6 microns), either directly onto the chromatographic strip or through a sample pad. As noted above, the membrane is preferably an S/G membrane (Spectral Diagnostics).

(2) Serum or plasma specimen flow towards the reaction region (capture lane and control lines) with pre-coated chemicals.

(3) Antigen or antibody in specimen react with corresponding reagents in reaction region (capture lane and control lines), form immuno-complex 1.

(4) Conjugate release buffer or sample (in some tests) is added to Port-2. the liquid (buffer or sample) will resolve the gold conjugated reagents (antigen or antibody), the reagents then flow towards the reaction region (capture lane and control lines) and react with immuno-complex 1. The colorful bands will be formed in control bands, and capture bands region, if the specimen is positive for the tested item.

(5) The absorbent located in the end near to Port 1 will absorb the excessive liquid that was not absorbed by the chromatographic strip.

The following examples are given by way of illustration to facilitate a better understanding of the invention and are not intended to limit the invention in any way.

EXAMPLE 1

In this example, the chromatographic strip is a nitrocellulose immunochromatographic test strip from Millipore Corporation (http://www.millipore.com; tech_service@millipore.com). This test strip was built into the cartridge described in U.S. Patent 6,136,610 ("the '610 patent), issued on October 24, 2000 to assignee PraxSys BioSystems, Inc., and entitled "Method and apparatus for performing a lateral flow assay," the contents of which are incorporated herein by reference in their entireties, including those materials that are incorporated by reference into the '610 patent. The double adhesive tap was made of polyester and was obtained from G& L Precision Cutting. The backing pad was made of plastic and was obtained from G&L Precision Cutting.

The sample filter was made of a blood cell/plasma separation membrane S/G. This sample filter was obtained from Spectral Diagnostics Inc. (135-2 The West Mall,

Toronto, Ontario M9C 1C2, Canada), and has been described in van Oudheusden, A.P.M. and Roesink, H.D.W., *Ann. Clin. Biochem.* 28:55-59 (1991); and U.S. Patent No. 5,240,862 ("the '862 patent"), issued August 31, 1993 to assignee X-Flor B.V. and Primecare B.V., entitled "Process and device for the separation of a body fluid from particulate materials." Other components used are conventional in the industry and can be ordered from any suitable vendor. For example, colloidal gold can be ordered from British BioCell International (Golden Gate, Ty Glas Avenue, Cardiff CF4 5DX, Wales, United Kingdom).

The sample pad and buffer pad were made of a hydrophilic material, Cytosep, which was obtained from Pall Specialty Materials.

The conjugate pad was made from conjugate release pads, a glass, hydrophobic material made by Whatman Inc. (401 West Morgan road, Ann Arbor, MI 48108-9109, U.S.A.) and obtained from Pall Specialty materials.

The absorbent was made of a hydrophilic material obtained from Whatman Inc.

EXAMPLE 2

In this example, the sample filter of Example 1 and the conjugate pad, respectively, was each placed directly on top of the nitrocellulose chromatographic membrane, and another sample filter was placed directly on the conjugate pad, all in a configuration as shown in FIG. 1 but without the intervening sample pad, selective membrane, and buffer pad. In this configuration, whole blood was applied to the sample filter in both positions, and the assay was allowed to run its course. Plasma or serum separation was similarly effective and efficient, with the sample fluid flowing into the reaction region, that is, the capture line, in about 90 to 150 seconds, for a chromatographic strip that is 1 cm in length.

EXAMPLE 3

In this example, a sample pad was added under the sample filter and a buffer release pad was added above the conjugate pad. Plasma or serum separation was similarly effective and efficient, with the sample fluid flowing into the reaction region, that is, the capture line, in about 90 to 150 seconds, for a chromatographic strip that is 1 cm in length.

EXAMPLE 4

In this example, blood samples, with or without anti-coagulant reagents were applied on the sample filter of Example 1. Plasma or serum separation was similarly effective and efficient, with the sample fluid flowing into the reaction region, that is, the capture line, in about 90 to 150 seconds, for a chromatographic strip that is 1 cm in length. When blood sample did not contain anti-coagulant, it was not necessary to pre-treat the sample filter with anti-coagulant. In fact, pre-treatment of sample filter with anti-coagulant damaged the sample filter, causing leakage of blood cells.

EXAMPLE 5

In this example, the use of a single layer of sample filter was compared with the use of 2 layers of sample filters. The use of a single layer of sample filter was found to produce a faster flow rate than the use of two sample filters together.

EXAMPLE 6

In this example, the size of the sample filter was varied to optimize the flow rate. For a sample of 50 to 150 microliter of blood sample, the optimal size found was 7 mm (width) by 13 mm (length). Relatively, the larger the size of the sample filter, the shorter the flow time.

EXAMPLE 7

In this example, buffer (50 to 150 microliter) was added about 30 to 60 seconds after a blood sample was applied to the sample filter. The flow time, that is, the time from application of sample to time for fluid to reach the capture line, decreased and the background signal was reduced.

EXAMPLE 8

Anti-HIV testing. An EIA anti-HIV assay confirmed patient blood specimen was collected with anticoagulant reagent. The plasma was collected from an aliquot of the blood sample. 100 microlitres of blood and 50 microliters of plasma were applied on Port 1 of an anti-HIV assay strip. 50 microliter of buffer was added onto Port 1 two minutes

after blood sample was applied. After about 20 minutes incubation time, the ReLIA instrument scanned and read the densities generated by the capture bands. The CV% of S/CO was 7.8%.

All of these aspects of the invention can be practiced separately or in combination. Further, although preferred embodiments of the subject invention have been described in some detail, it is understood that obvious variations can be made without departing from the spirit and the scope of the invention.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A test strip comprising

(a) a first membrane comprising a chromatographic strip having a first end and a second end; and

(b) a sample filter having an upper surface and a lower surface, wherein the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip; wherein the sample filter is capable of separating cells in a sample from fluid in the sample and allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and further wherein the test strip facilitates lateral flow of fluid from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

2. The test strip of claim 1, wherein the sample filter comprises pores of varying sizes and wherein cells in the sample are retained by the sample filter and fluid in the sample passes through the sample filter.

3. The test strip of claim 2, wherein the sample filter comprises first pores having a first pore size and second pores having a second pore size, wherein the first pores are larger than the second pores and further wherein the first pores are closer to the upper surface of the sample filter and the second pores are closer to the lower surface of the sample filter.

4. The test trip of claim 1 or claim 2, further comprising (c) a sample pad close to the first end of the chromatographic strip and wherein the sample pad allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and further wherein the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

5. The test strip of claim 3, further comprising (c) sample pad comprising an upper surface and a lower surface, wherein the lower surface of the sample pad is in

capillary contact with the chromatographic strip and wherein the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the upper surface of the sample pad and further wherein the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the second end of the chromatographic strip.

6. The test strip of claim 4 or claim 5, further comprising a selective membrane in capillary contact with the sample filter and the sample pad.

7. The test strip of claim 6, wherein the selective membrane is positioned under the sample filter.

8. The test strip of claim 6, wherein the selective membrane is positioned on top of the sample pad or on top of the chromatographic strip.

9. The test strip of claim 6, wherein the selective membrane contains an agent that selectively binds to a component in the sample and removes the component from the assay environment.

10. The test strip of claim 9, wherein the agent is selected from the group consisting of an antibody, an antigen, a metabolite, a hormone, an enzyme, a virus, a prion, or parts thereof, and an agent that binds to such.

11. The test strip of any of claims 1 to 10, further comprising one or more filters or membrane positioned between the sample filter and the chromatographic strip.

12. The test strip of any of claims 4 to 11, further comprising

(d) a conjugate pad comprising an upper surface and a lower surface, wherein the conjugate pad is at or near the second end of the chromatographic strip and wherein the lower surface of the conjugate pad is in capillary contact with the chromatographic strip;

(e) a reagent pad comprising an upper surface and a lower surface, wherein the lower surface of the reagent pad is in capillary contact with the upper surface of the conjugate pad; and

(f) an absorbent pad at the first end of the chromatographic strip and to a side of the sample pad that is away from the conjugate pad, wherein the absorbent pad is in capillary contact with the chromatographic strip; and wherein the sample filter is capable of separating the cells from the fluid in the sample and the test strip supports lateral flow of fluid in the sample from the sample pad towards the conjugate pad.

13. The test strip of claim 12, wherein the reagent pad further comprises a reagent.

14. The test strip of claim 13, wherein the reagent is a buffer.

15. The test strip of claim 12, wherein the conjugate pad comprises a conjugate that can be released from the conjugate pad upon application of fluid to the conjugate pad, wherein the conjugate is capable of combining with an analyte to be detected to form a detectable signal.

16. The test strip of claim 12, wherein the conjugate comprises a first binding agent that is capable of binding to an analyte.

17. The test strip of claim 16, wherein the first binding agent is an antibody or antigen.

18. The test strip of claim 16, wherein the conjugate further comprises a second binding agent.

19. The test strip of claim 18, wherein the second binding agent comprises a detectable marker that binds either to the first binding agent or to the analyte.

20. The test strip of claim 19, wherein the detectable marker is quantifiable.

21. The test strip of claim 15, the conjugate flows from the conjugate pad to come into contact with the fluid from the sample and forms an immobilized complex.

22. The test strip of claim 15, wherein the conjugate pad is situated between the sample filter and the second end of the chromatographic strip, and the flow of fluid from the sample filter to the conjugate pad to releases the conjugate from the conjugate pad.

23. The test strip of claim 15, wherein the conjugate pad is situation under the sample filter and is in capillary contact with the sample filter.

24. The test strip of any of claims 1 to 23, wherein the chromatographic strip further comprises an adhesive layer and a backing for the adhesive layer.

25. The test strip of any of claims 1 to 24, wherein the membrane comprises nitrocellulose.

26. The test strip of any of claims 1 to 25, wherein the sample filter is a blood cell/plasma separation membrane.

27. The test strip of any of claims 1 to 26, wherein the sample comprises fluid and cells.

28. The test strip of any of claims 1 to 26, wherein the sample is a blood sample, a saliva sample, a urine sample, sample taken from lymphatic tissues, a sample from a spinal tap, or a sample taken from a peritoneal cavity, synovial fluid from a joint, or fluid from lungs.

29. The test strip of claim 28, wherein the sample comprises red blood cells.

30. The test strip of any of claims 1 to 29, wherein the sample filter comprises a hydrophilic surface that contacts the sample.

31. The test strip of any of claims 1 to 30, wherein the sample filter comprises an S/G membrane.

32. A method of making a test strip comprising the steps of

(a) providing a chromatographic strip having a first end and a second end; and

(b) providing a sample filter having an upper surface and a lower surface, wherein the lower surface of the sample filter is in capillary contact with the chromatographic strip; wherein the sample filter is capable of separating cells in a sample from fluid in the sample and allows the fluid to pass through to the chromatographic strip, and further wherein the test strip facilitates lateral flow of fluid from the sample filter towards the second end of the chromatographic strip.

33. The method of claim 32, further comprising the step of

(c) placing a sample pad between the sample filter and the chromatographic strip, wherein the sample pad is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip, and fluid flows from the sample filter through the sample pad to the chromatographic strip by capillary or osmotic forces.

34. The method of claim 33, further comprising the step of

(d) providing a conjugate pad on the chromatographic strip, wherein the conjugate pad is in capillary contact with the chromatographic strip, and fluid flows through the conjugate pad to the chromatographic strip by capillary or osmotic forces.

35. The method of claim 34, further comprising the step of

(e) providing a reagent pad on the conjugate pad, wherein the reagent pad is in capillary contact with the conjugate pad and allows the flow of fluid from the reagent pad to the conjugate pad.

36. The method of claim 35, further comprising the step of

(f) providing a selective membrane between the sample filter and the chromatographic strip, where the selective membrane is in capillary contact with the sample filter and the chromatographic strip and allows the flow of fluid from the sample filter to the chromatographic strip.

37. A method of separating cells from fluid in a sample for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in the sample, comprising the steps of:

(a) providing a test strip according to any of claims 1 to 31; and

(b) applying the sample on the sample filter, thereby separating cells from fluid in a sample.

38. A method of conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid, comprising the steps of:

(a) providing a test strip according to any of claims 15 to 31;

(b) applying the sample to the sample filter;

(c) allowing flow of fluid from the sample filter to the chromatographic strip and towards the second end of the chromatographic strip;

(d) applying a buffer to release the conjugate in the conjugate pad;

(e) allowing flow of the conjugate towards the analyte in the sample to form a complex; and

(f) detecting presence of the complex.

39. The method of claim 38, further comprising the step of:

(g) quantifying amount of complex formed.

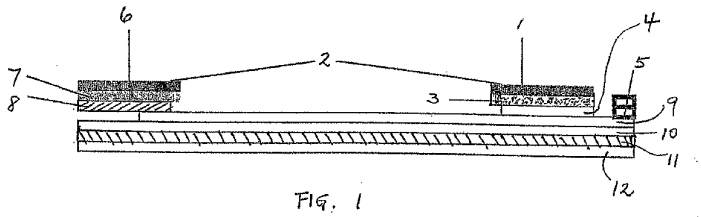


FIG. 1

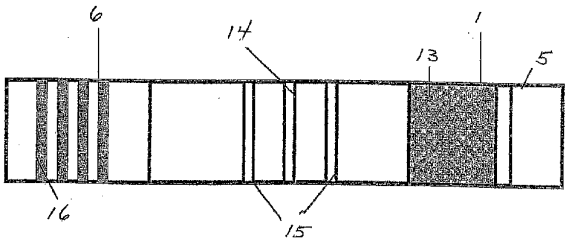


FIG. 2

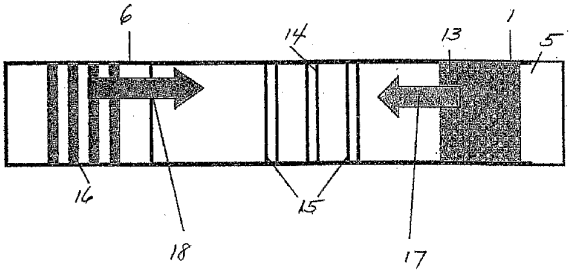


FIG. 3

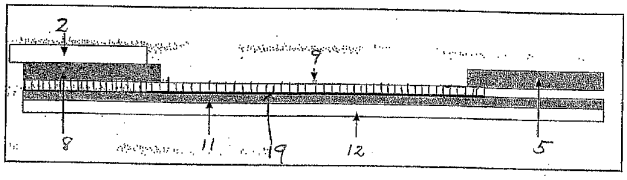


FIG. 4

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008933 A3

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/543

(21) International Application Number: PCT/US02/23164

(22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/306,660 18 July 2001 (18.07.2001) US

(71) Applicant and
(72) Inventor: ZHOU, Siliang [US/US]; 2711 Markham Court, Hayward, CA 94542 (US).

(74) Agents: ROBINS, Roberta, L. et al.; Gooley Godward LLP, 3000 El Camino Real, Five Palo Alto Square, Palo Alto, CA 94306 (US).

(81) Designated States (national): AE, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

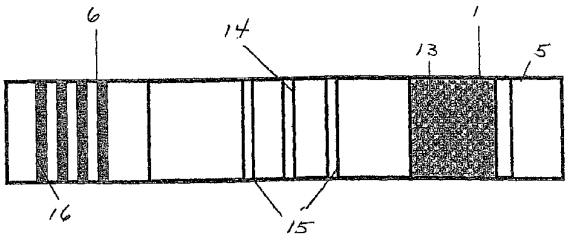
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
30 May 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: TEST STRIP FOR A LATERAL FLOW ASSAY



(57) Abstract: A test strip (Figure 2) for conducting a lateral flow assay for detection of an analyte in a sample that contains cells and fluid is provided, as well as methods for making and using the test strip. This test strip is commercially usable, for example, in a diagnostic device at a point of care for detection of analytes in whole blood.

WO 03/008933 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/23164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : G01N 33/543
US CL : 436/518
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 436/518

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EAST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,602,040 A (MAY et al) 11 February 1997. See entire document.	1-39
X	US 5,234,813 A (McGEEHAN et al) 10 August 1993. See entire document.	1-39
X	US 5,656,448 A (KANG et al) 12 August 1997. See entire document.	1-39
X	US 5,712,172 A (HUANG et al) 27 January 1998. See entire document.	1-39
X	US 5,766,552 A (DOSHI et al) 16 June 1998. See entire document.	1-39
X	US 5,821,073 A (LEE) 13 October 1998. See entire document.	1-39
X	US 5,985,675 A (CHARM et al) 16 November 1999. See entire document.	1-39
X	US 6,001,658 (FREDRICKSON) 14 December 1999. See entire document.	1-39
X	WO 99/18439 A1 (UCB BIOPRODUCTS, S.A.) 15 April 1999. See entire document and US equivalent.	1-39

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 October 2002 (29.10.2002)

Date of mailing of the international search report
10 APR 2003

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Bao-Thuy L. Nguyen
Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/23164

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZW